

X線全身照射後のラット血漿中における巨核球成長刺激活性

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

三 浦 正 義

(昭和60年7月15日受付)

in vitro における骨髓巨核球前駆細胞の増殖分化の調節に関する知見を得るために、ラットにX線全身照射を行い、骨髓細胞の減少、血小板減少を誘導し、ラットの血漿中における巨核球成長刺激活性 [Megakaryocyte growth-promoting activity (Meg-GPA)] を in vitro 巨核球コロニー形成法を用いて測定した。血漿は、 ^{137}Cs により、834 rad の X 線全身照射後、最初は数時間間隔、後には数日間隔で経時的に X 線照射後 21 日目まで採取し、メチルセルロースを用いた in vitro 巨核球コロニー形成培養系に 30% の濃度で添加された。血漿中 Meg-GPA の経時的変動には 2 つのピークが認められた。第 1 のピークは照射後 12 時間目で、骨髓巨核球減少あるいは末梢血血小板減少が生ずる以前であった。第 2 のピークは照射後 10~14 日目であり、巨核球数はすでに回復を始めた時期であり、血小板数はまだその最低値の時期であった。添加した血漿濃度と巨核球の増殖との関係を X 線照射後 11 日目のラットの血漿を用いて検討したが、単巨核球の出現は 30% 以下の低い血漿濃度でも多くみられたが、クラスター (2~3 個の巨核球の集塊) とコロニー (4 個以上) 形成は 30% が至適濃度であった。40% の血漿濃度では、単巨核球、クラスター、コロニーのいずれもが減少した。照射後 11 日目の血漿 30% の条件下では、植え込んだ骨髓細胞数と発育した単巨核球数、クラスター、およびコロニーの数の関係を調べたところ、いずれもほぼ直線関係が認められた。以上の結果から、X 線照射を行ったラットは、in vivo における Meg-GPA と骨髓巨核球数あるいは、末梢血血小板数との関連をみる上で非常に優れた実験モデルであると言える。

Key words megakaryocyte growth-promoting activity, whole body irradiation, plasma

in vitro における巨核球培養の技術が開発されて以来、巨核球-血小板産生系の理解がより深いものとなってきた。これまで巨核球コロニー形式のためには 2-mercaptoethanol (2-ME)¹⁾あるいは pokeweed mitogen (PWM)²⁾⁻⁶⁾とともに培養した脾細胞、それに WEHI-3⁷⁾、Buffalo rat liver⁸⁾などから得られる上澄 (conditioned media) などが用いられてきたが、その精しい生理学的な意味は不明な点が多かった。近年 Hoffman ら⁹⁾は再生不良性貧血あるいは骨髓の巨核球数減少を認める血小板減少性紫斑病の患者血清中には、人巨核球コロニーの数および大きさを増強させる因子が含まれていることを報告した。その報告では、in vitro における巨核球コロニー刺激因子の産生は、末梢血における血小板の減少よりもむしろ、骨髓の巨核球の減少に関連がより深いのではないかと推測した。他方これとは対照的に、榎本¹⁰⁾や河北ら¹¹⁾は再生不

良性貧血だけではなく、骨髓中の巨核球は通常はやや増加しているか、正常である血小板減少性紫斑病患者の尿からの抽出物も同様に in vitro におけるマウス巨核球コロニー産性を刺激し、さらに in vivo においても巨核球ならび血小板増多をもたらすことを報告した。これら臨床の場から得られた材料で提起された疑問を解決するために、実験的に末梢血および骨髓の細胞数減少を誘導し、そのモデルを用いての試みが巨核球前駆細胞の増殖分化過程を理解する上で最も適していると考えた。本研究では、ラットに X 線の全身照射を行った後、血漿を一定の間隔で採取し、血漿中の巨核球コロニー形成刺激活性を in vitro で測定し、in vivo における骨髓巨核球数あるいは末梢血血小板数のいずれが、Meg-GPA のレベルとより関係が深いかを明らかにしようと試みた。本稿では、巨核球コロニー刺激活性 (Megakaryocyte colony-stimulating

Abbreviations: Meg-GPA, Megakaryocyte-growth promoting activity; 2-ME, 2-Mercaptoethanol; PWM, Pokeweed mitogen.

activity)という言葉を用いるかわりに、巨核球成長刺激因子 [Megakaryocyte growth-promoting activity (Meg-GPA)] を用いた。その理由は、本研究で使用した血漿は、4個以上の巨核球で構成される巨核球コロニーのみならず、2個あるいは3個の巨核球の集塊で定義されるクラスターあるいは single megakaryocyte (「単巨核球」) の産生も促進したからである。

材料および方法

I. 使用動物と X 線照射

体重 250~300 g の雄 Long-Evans 系 ラット (Blue Spruce Farms, Altamont, N. Y.) を使用した。X 線照射には Cesium 137 の照射器を用い、1 回に 4~6 匹のラットをラットホルダーに固定し、417 rad/min の照射量で 2 分間 (総量 834 rad) 照射した。X 線照射後ラットにはフィルターを通し紫外線をあてた水を与え感染を予防した。

II. 血液のサンプリング

ラットをエーテルにて麻酔し、足の外側静脈より 27 ゲージ針を用いて血液を採取した。血小板数の算定には、10 μ l の血液を 1% 蔞酸アンモニウム 0.99 ml と混合し、位相差顕微鏡を用いた。ヘマトクリットは 75 mm のヘパリン化した微量管を用いて測定した。Meg-GPA の測定を行う血液は、エーテル麻酔をしたラットの腹部大動脈から 300 units のヘパリンを含む注射器にて採取した。3 ないし 4 匹のラットより採取した血液をプールし、血漿を分離後 Meg-GPA の測定まで -80°C で保存した。

III. ラット骨髄中の巨核球数の算定

ラットの胸骨より骨髄切片を採取し、B-5 fixative で固定、脱灰後ヘマトキシン・エオジンにて染色を施した。平均巨核球数を $\times 500$ 倍率にて算定した。それぞれのラットの胸骨骨髄の縦一列全部の巨核球を数え、X 線未照射ラットの巨核球数に対する百分率をもって表した。巨核球数は巨核球の大きさによる補正は行わなかった。

IV. 骨髄巨核球直径の測定

接眼鏡内のマイクロメーターを用いて 3 ないし 4 匹のラット胸骨骨髄切片から、それぞれ 50 の巨核球を任意に選び、その直径を $\times 1250$ の倍率下で測定した。

V. 骨髄細胞培養

エーテル麻酔をしたラットを脱血により絶命させ、脛骨から骨髄を得た。骨髄は 3 ml の Alpha Media で注意深くピペットを用いてかく拌し、さらに細胞の凝塊を除くため、25 ゲージの針を通過させた後、細胞培養に供するまで水中に保存した。骨髄巨核球の培養は Messner ら¹²⁾によって記載された方法に準じ、一部改

変して行った。即ち、本実験では conditioned media を全く用いず、代りに被検血漿検体を添加した。2 $\times 10^5$ 個の骨髄細胞を最終濃度 5 $\times 10^{-8}$ M 2-ME および 1.1% メチルセルロースを含む Iscove の Dulbecco's medium (GIBCO, Grand Island, N. Y.) 1 ml に植え込んだ。さらに Meg-GPA を測定しようとする被検血漿を最終濃度 30% となるように添加した。これらを 35 mm のプラスチック皿 (5221-R Flow Laboratories, McLean, V. A.) に無菌的に植え込み CO₂ 孵卵器中で 5% CO₂, 37°C の条件下で 7 日間培養した。同一検体はそれぞれ 4 個の培養皿を使用した。

VI. メチルセルロース培養液中に増殖した巨核球の同定

ラット骨髄細胞の中で巨核球ならびにその前駆細胞は組織化学的にアセチルコリンエステラーゼ活性を有する唯一の細胞である¹³⁾¹⁴⁾。それゆえ、Karnovsky と Roots のアセチルコリンエステラーゼ染色法¹⁵⁾の変法により、巨核球を固定した。すなわち 7 日間の培養の後培地に直接 5 ml のアセチルコリンエステラーゼ基質 (0.2 M クエン酸, pH 5.8 に溶解) を静かに加え、30~40 分間室温に放置した。アセチルコリン陽性細胞は 4 個以上の密に集ったものをコロニー、2~3 個の集塊をクラスター、1 個を単巨核球と同定した。

VII. 統計学的検討

成績は Student's t-test を用い、推計学的に検討を加え、 $p < 0.05$ の時を有意差ありと判定した。

成 績

I. 巨核球と血小板の推移

図 1 にラットの全身 X 線照射後 21 日目までの骨髄巨核球数および末梢血血小板数の推移を示す。照射後 1 日目、巨核球と血小板数は統計学的に有意な差は認めなかったが、対照値 (X 線照射前値) のレベルを一時越える傾向が認められた。(血小板 $p < 0.30$, 巨核球 $p < 0.15$)。その後、巨核球数は 3 日目までに対照の 1/2 に減少 ($p < 0.005$)、7 日目にはコントロールの 10% 以下にまで低下した。血小板数は、巨核球の減少より 2 日程遅れて同じように減少した。X 線照射 10 日後、巨核球の増多がはじまり、血小板数も巨核球数に約 4 日間遅れて増多を示した。

II. 骨髄巨核球直径の推移

骨髄巨核球の直径は、X 線照射後増多を示し、8 日目には対照より約 30% 大きくなり ($p < 0.05$)。その後も同じようなレベルを保った。この結果は Ebbe らの報告¹⁶⁾と同様の傾向であった。

III. X 線照射後のヘマトクリットの推移

図 3 に X 線 834 rad 照射後のヘマトクリットの推

移を示す。5日目までは幾分増多傾向を示したが(最高値48%, $p < 0.15$)その後減少し、12日目には28%となり($p < 0.005$), X線照射後21日目までにはヘマトクリットはほとんど正常値にまで復した。

IV. 巨核球コロニーの同定

X線未照射の正常ラット血漿を用いた場合巨核球コロニー形成はなく、クラスターおよび単巨核球のみが観察された。一方、X線照射を行ったラットの血漿を用いた場合、巨核球コロニーは顕微鏡下で通常は他

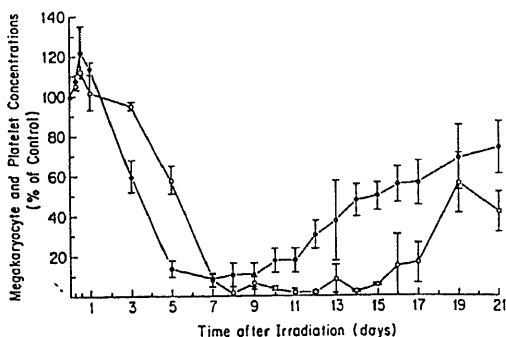


Fig. 1. megakaryocyte and platelet concentration (% of control) after irradiation (834 rad). Each point represents the mean \pm SEM for 3 or 4 rats, except for days 8 when megakaryocyte concentration was determined on only 2 rats. Open circles; platelets, closed circles; megakaryocytes. The control megakaryocyte concentration was 6.0 ± 0.4 per high-power field (4 rats); megakaryocyte values were not corrected for changes in cell size. The control platelet concentration was $1,000,000 \pm 100,000/\text{cu mm}$ (4 rats).

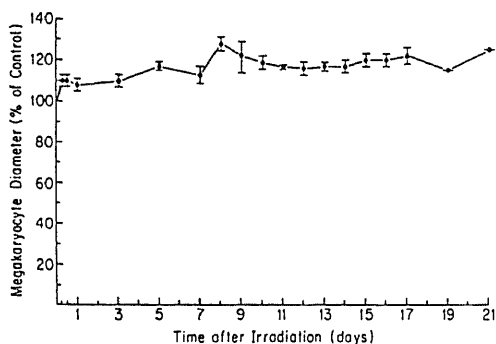


Fig. 2. Megakaryocyte diameter after irradiation (834 rad). Each point represents the mean \pm SEM for cells from 3 or 4 rats, except for days 8 when sections were obtained on only 2 rats; values are expressed as percentage of untreated controls. The control megakaryocyte diameter was $20 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (4 rats).

の細胞より角ばって大きく、また細胞質は光の透過性が強く、光の屈折性の強い細胞膜にも特徴が認められる。アセチルコリンエステラーゼ染色でこれらの細胞が明瞭に染色されるのが認められた(図4)。

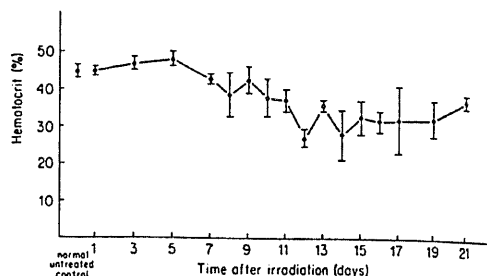


Fig. 3. Hematocrit of rats after irradiation (834 rad). Each point represents the mean \pm SEM for 3 or 4 rats.

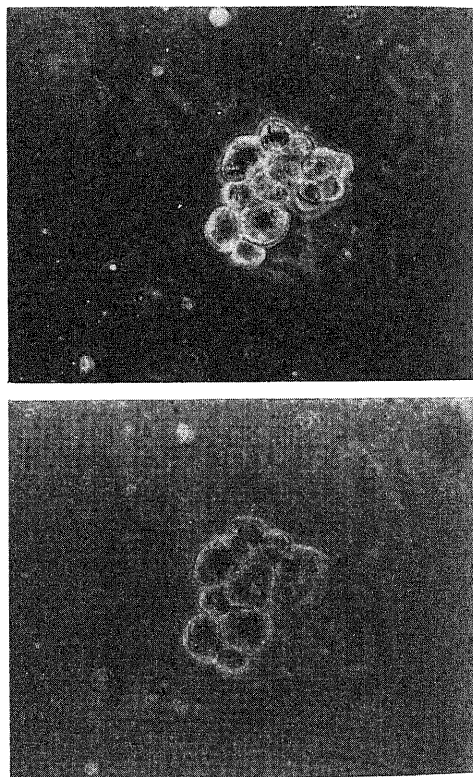


Fig. 4. Example of rat megakaryocyte colony after culturing for 7 days. (A) Unstained colony (note refractory cell border and rather angular shape): (B) same colony as A, showing positive reaction after 30 min-incubation with modified acetylcholinesterase substrate added directly to the dish.

V. X線照射後の血漿 Meg-GPA の推移

図5に照射後24時間以内の、また図6にその後のMeg-GPAの推移を示す。Meg-GPAの経時的変動には2つのピークが認められた。第1のピークは非常に早く、照射後12時間であり、骨髓細胞 2×10^5 あたり平均40個の単巨核球、8個のクラスター、3個のコロニーを刺激した。これは、照射1日目のin vivoにおける巨核球数の増多(図1)に先がけて認められた。照射12時間目のラットから得られた血漿は、顆粒球-マクロファージ系前駆細胞(colony-forming unit granulocyte and macrophage)やDimethoxy benzidine陽性細胞の形成も促した。放射線照射後12時間目よりMeg-GPAは24時間までには急速に減少した。Meg-GPAの第2のピークは照射後10~14日目に認められ、この時期は末梢血血小板数が最低値をとった時期と一致した(図6)。それ以後、巨核球コロニー刺激活性は徐々に低下し、放射線照射後21日目にはほぼ消失した。単巨核球とクラスター形成は、コロニー形成と類似したパターンを示したが、コロニー数よりも多く、より長期に持続した。すなわち照射後21日目、実験終了時点でも依然として有意のクラスターおよび単巨核球の形成が認められた。

VI. in vitroにおける巨核球の増殖と血漿濃度との関係

図7に培養系の血漿の濃度と各巨核球の増殖数との関係を示した。コロニー・クラスター、単巨核球それぞれにおいて30%の濃度の血漿を用いた場合が最適条件となった。10%の低濃度では、30%濃度の場合に

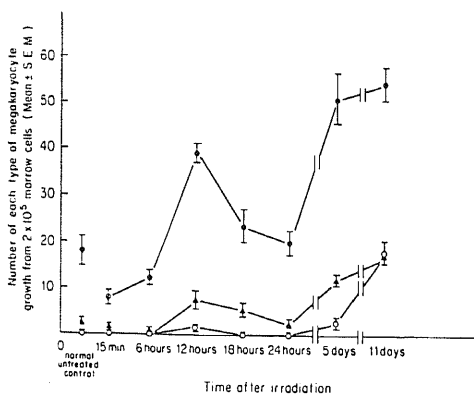


Fig. 5. Megakaryocyte growth-promoting activity of plasma collected early after irradiation (834 rad). Open circles; colonies of 4 or more megakaryocytes, closed triangles; clusters of 2 or 3 megakaryocytes, closed circles; single megakaryocytes. Each point represents the mean \pm SEM for 4 replicate dishes.

比べてコロニーの形成は非常に悪く、単巨核球の比率が増加した。血漿濃度を40%にすると、コロニー、クラスターおよび単巨核球すべてが減少した。

VII. 培養に供した骨髓細胞数 in vitroにおける巨核球形成との関連

X線照射後11日目の血漿30%を用い、植え込んだ細胞数と形成された巨核球との関連を検索した。図8に見られるように、植え込んだ細胞数と巨核球コロニーの相関係数 r は0.944 ($p < 0.02$)となった。また最小二乗法により回帰直線を求めたところ、回帰係数は5.19, interceptは0.14の数字を得た。クラスターは、 $r = 0.954$ ($p < 0.02$)、回帰直線は回帰係数は4.62, interceptは1.10でコロニーと非常に似た値となった。これらとは対照的に、単巨核球においては、回帰係数は10.80とコロニーやクラスターの2倍の値を示したが interceptは1.59でコロニーやクラスターと同様であった。相関係数 r は0.986 ($p < 0.005$)と高い値を示した。

VIII. in vitroにおける巨核球形成と2-MEの役割

in vitro megakaryocyte形成における2-MEの役割を検討するため、2-MEを培養系に添加した場合と無添加の場合を比較した。X線照射後11日目のラット血漿を用い、培養開始後7日目に、単巨核球、クラスターおよびコロニー数を算定した。表1に示すように2-MEを加えない群では、観察されたコロニー、ク

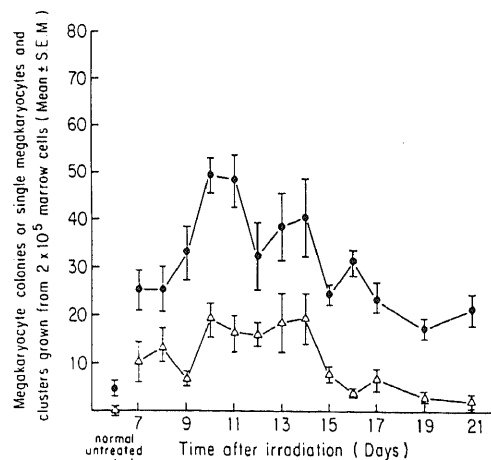


Fig. 6. Megakaryocyte growth-promoting activity of plasma collected during the second and third week after irradiation (834 rad). Open triangles; colonies of 4 or more megakaryocytes, closed circles; combination of single megakaryocytes and clusters of 2 or 3 megakaryocytes. Each point represents the mean \pm SEM for 4 replicate dishes.

ラスターおよび単巨核球はそれぞれ加えた群の約半数であった。

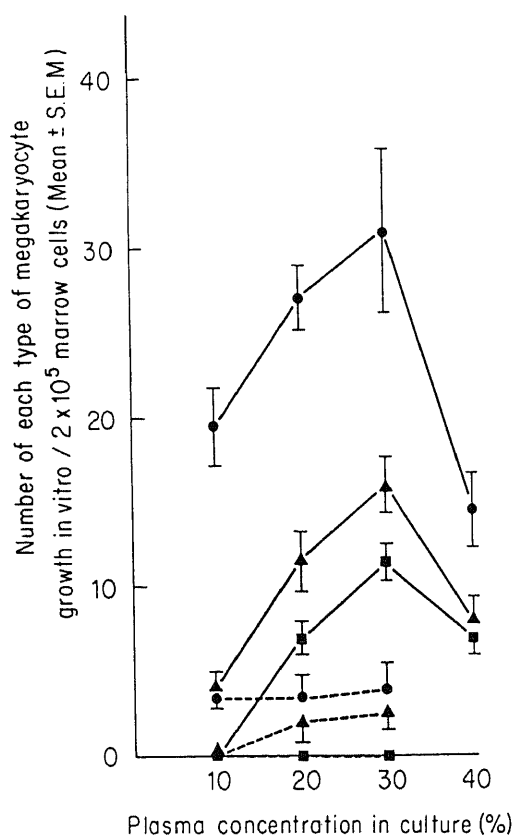


Fig. 7. Megakaryocyte growth in vitro versus plasma concentration. Circles; single megakaryocytes, triangles; clusters of 2 or 3 megakaryocytes, squares; colonies of 4 or more megakaryocytes. Solid lines; plasma collected 11 days after irradiation (834 rad), broken lines; plasma from untreated rats. Each point represents the number of single cells, clusters or colonies (mean \pm SEM) grown from 2×10^5 marrow cells in replicate dishes.

考 察

これまで in vitro 細胞培養系における巨核球コロニー形成の研究は、そのコロニー形成促進因子として、主に各種培養細胞系の conditioned media を用いて行われてきたが、それらの生体内における造血幹細胞の増殖・分化に対する役割、特に生体内における巨核球-血小板産生系の調節制御との関連は不明な点が多かった。

今回の研究はラットに X 線を照射した後、経時的に血漿を採取し Meg-GPA を測定したものである。Messner ら¹²⁾は血漿を用いた場合、血清よりも巨核球コロニーの増殖がよかった事を報告している。また

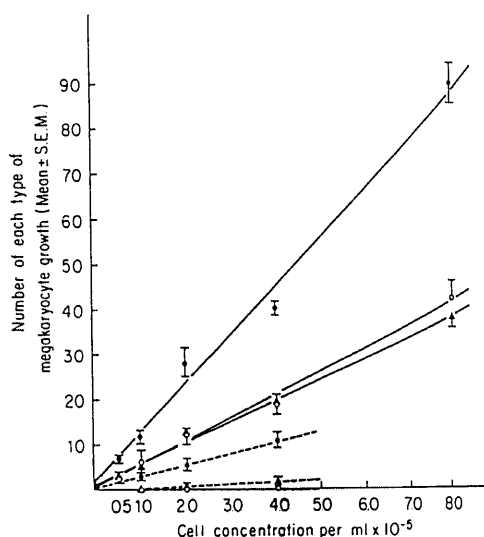


Fig. 8. Megakaryocyte growth in vitro versus number of cells plated. Solid circles; single megakaryocytes, solid triangles; cluster of 2 or 3 megakaryocytes, open circles; colonies of 4 or more megakaryocytes. Solid lines; plasma collected 11 days after irradiation (834 rad), broken lines; plasma from untreated rats.

Table 1. Effect of 2-mercaptoethanol on megakaryocyte formation in cell culture

2-Mercaptoethanol	Megakaryocyte growth from 2×10^5 marrow cells*		
	single	cluster	colony
5×10^{-5} M	$27.5 \pm 2.6^{\#}$	14.5 ± 2.2	12.0 ± 0.8
none	16.5 ± 0.5	8.5 ± 1.5	5.5 ± 1.0

* Cultures contained 30% plasma collected from rats 11 days postirradiation.

[#] Mean \pm SEM. (n=4)

In this experiment, control cultures with 30% plasma from untreated rats and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol contained 7.0 ± 0.6 single megakaryocytes, 2.5 ± 1.9 megakaryocyte clusters, and no megakaryocyte colonies.

Vainchenker¹⁷⁾はヒト血清中には巨核球コロニーの形成を抑制する因子が含まれていると述べている。このため本研究では、血清を用いるかわりに血漿を使用した。

Meg-GPAの変動には2つのピークが認められ、第1はX線照射後12時間目、生体内において、骨髓巨核球数あるいは末梢血血小板数が減少する以前、むしろ一時的に増加する時期であった。この反応の機序は明らかではないが、最近の報告¹⁸⁾によると、細胞培養系に放射線照射を行った骨髓細胞を添加すると各種コロニー形成が促進される事が述べられており、成長刺激因子がX線照射12時間目頃放射線によって障害を受けた細胞から遊離されるのであろうと推論されている。X線照射をしたラットからの血漿がin vivoにおいて白血球増多を惹起する事も知られている¹⁹⁾。Odellら^{20,21)}は骨髓中の巨核球数と末梢血中の血小板数がX線照射後1日目、やや増加する事を報告しているが、本実験においても巨核球数と血小板数の変動について同様の結果が得られた。

Meg-GPAのX線照射後10~14日目における第2のピークは、おそらく巨核球数および血小板数の減少と結びついていると思われる。前述したようにHoffmanら⁹⁾は再生不良性貧血および血小板減少性紫斑病の患者血清を用いての研究で、in vivoにおける巨核球産生刺激因子の産生は末梢血血小板数の減少よりも、むしろ骨髓巨核球数の減少により深く関連があると述べている。本研究によるとMeg-GPAの高い時期は、巨核球数が減少した時期というより、むしろ血小板数が最も低下した時期とより強く関連していると思われた(図6)。しかし、この問題はいくつかの研究室で、抗血小板抗体を用い血小板減少を誘導した動物実験で相反する結果が出ていることから早急な結論は出せないように思われる。Levinら⁵⁾は、血小板特異血清を注射する事により、血小板減少を惹起したウサギの血漿は、巨核球コロニー形成を刺激しない事を見出した。これに反しNakeffら²²⁾は、抗血小板血清を用い、血小板減少をひきおこしたマウスの血清は、巨核球コロニー形成を促した事を報告している。Levinら⁵⁾は、抗血小板抗体の注射が、他の血液前駆細胞にも影響を与え、その反応は当初予想されたような単純なものではないのかもしれないと述べている。この問題を解決するためには、さらに多くの研究を要するものと思われる。

放射線照射後は、血液あるいは血漿量に変化が起こり、照射後5日間のヘマトクリットの変動は必ずしも、血流中における赤血球数の実際の変化をあらわしているものではない事はよく知られている。実験後半(X

線照射10日目~19日目)におけるヘマトクリットの減少は主として、赤血球系細胞増殖の低下ならびに出血によるものの両者が関与している²³⁾。これまで、巨核球コロニー培養系において、エリスロポエチンの持つ役割が強調されてきたが^{24)~26)}、本研究において、ヘマトクリットとMeg-GPAの間に特にはっきりした相関は認められなかった。

前述したように、本研究においては、X線照射後11日目のラットの血漿を用い、巨核球コロニーの形成を調べるとともに、単巨核球および2ないし3個の巨核球で構成されているクラスターについても検討した。単巨核球に関しては、これまでも幾つかの報告があるが⁷⁾²⁵⁾²⁷⁾、本研究においても、30%のX線照射ラットからの血漿を刺激因子として用いることにより、骨髓細胞 2×10^5 あたり18.5~54.0(平均32.7)の単巨核球を得た。これはX線照射ラット血漿を刺激因子として用いる事により、骨髓中の血液幹細胞がin vitroで巨核球へと分化する事を示すものである。単巨核球を形成する血液前駆細胞が、コロニー形成の前駆細胞よりも、刺激因子に対してより感受性が高い事は、(1)単巨核球とクラスターに対する刺激因子が、放射線照射後コロニーに対する刺激因子よりも早く出現し、かつ遅くまで残る事(図6)、(2)10%濃度の放射線照射血漿でも、30%の血漿の場合の2/3もの単巨核球を刺激するのに対して、コロニーの形成は全く促さなかった事(図7)、(3)過去の報告で、急激な血小板減少を起こした直後、数時間でin vivoにおいてアセチルコリンエステラーゼ陽性細胞、すなわち巨核球の前駆細胞と考えられる細胞の増加を認めた¹⁴⁾²⁸⁾が、急激な血小板減少を引き起こしても、数日後になるまでin vitroにおいて巨核球コロニー形成細胞の変化を認めなかった⁵⁾²⁹⁾などの例がある事より推測できる。Williamsら³⁰⁾は、2つの刺激因子が巨核球コロニー形成の過程で必要であると述べている。1つは巨核球コロニー形成刺激因子(Megakaryocyte colony-stimulating factor)と呼ばれるもので、細胞分裂ひいてはコロニー形成を刺激する因子であり、他は巨核球分化刺激因子とも言えるもので、巨核球への分化を刺激し、コロニーの大きさとコロニーを形成している細胞のploidyと細胞容積の増加を促すものである。これら2つの因子の存在を前提にして考えると、本実験系において、X線照射後、早期あるいは晩期の単巨核球およびクラスター刺激因子がコロニー形成刺激因子に比べて、より高いことが容易に説明できる。つまり、単巨核球への分化を促す巨核球分化刺激因子が、この実験中の初期および晩期に存在する一方、巨核球コロニー形成刺激因子はラット生体の中でX線照射第2週に主として生産される

との解釈である。別の説明としては、放射線照射ラットからの血漿中に含まれるのは1つの因子だけであり、ただ巨核球コロニー形成のためには、単巨核球あるいはクラスター形成の場合に必要な量以上に多くの因子が必要とされるというものである。

巨核球コロニーに関しては、これまで多くの研究室からさまざまな報告があり、多くの矛盾点が指摘され、またそれぞれの結果の比較も困難であった。最近のLevinの報告³¹⁾で見られるように、その混乱の原因のいくつかは現在使われている巨核球培養系が複雑な事であり、かつ刺激因子として使われている物質の物理的、生化学的特徴がよくわかっていないためであろうと思われる。巨核球コロニーを得るためには、胎児仔牛血清^{11)24)~6)24)}、馬血清³²⁾³³⁾、ヒト血清³⁴⁾³⁵⁾、などの蛋白複合体の他に、conditioned media^{11)~8)}、エリスロポエチン^{24)~26)}、あるいは血小板減少症の患者から得られた血清⁹⁾³⁶⁾や尿抽出物¹⁰⁾¹¹⁾³⁷⁾³⁸⁾が必要である。その中でも、とりわけconditioned mediaの多様性が、研究の進歩の妨げとなっているのかもしれない。X線照射をしたラット血漿を用いる事により、巨核球培養系をより簡素に、かつ再現性のあるものにする事ができる。X線照射後11日目の血漿を用いた場合、培養に供した骨髓細胞数と形成されたコロニー、クラスターおよび単巨核球数との間に、ほぼ0点を通る直線関係が認められた。このことは、本実験系を利用して、骨髓巨核球前駆細胞の定量的測定が可能である事を意味する。2-MEはこの系において、培養条件を至適なものとするために不可欠のように思われる。

結 論

in vivoにおける巨核球前駆細胞増殖調節機構についての知見を得るために、X線全身照射ラットモデルを開発し、その血漿中の巨核球成長刺激因子(Meg-GPA)をin vitro巨核球コロニー形成法で測定し、以下の結論を得た。

(1) X線照射後の経時的変動で、2つのMeg-GPAのピークが認められた。第1は、X線照射後12時間目であり、第2は照射後10~14日目、この第2のピークは末梢血血小板減少の時期とほぼ一致するものであった。

(2) 巨核球コロニー刺激活性はX線照射後21日目までに消失するが、巨核球クラスター、ならびに単巨核球形成刺激活性はより長期に残存した。

(3) 本実験系における至適血漿濃度は、巨核球コロニー、クラスター、単巨核球とも30%であった。

(4) ヘマトクリットとMeg-GPAの間には特に明瞭な相関は認められなかった。

(5) 植え込んだ骨髓細胞数とコロニー、クラスター、単巨核球形成刺激活性の間には直線関係が成立した。

(6) 本培養系において6-メルカプトエタノールは $5 \times 10^{-5}M$ の濃度で、巨核球形成刺激活性を増強した。

(7) X線全身照射を行ったラットモデルは骨髓細胞培養系において、単に今までなかったMeg-GPAの信頼性ある、かつ再現性の強い供給源であるのみならず、Meg-GPAとin vivoにおける巨核球数あるいは血小板数との関連を研究する上において非常に有用なモデルであり、骨髓移植の実験モデルとしても応用できる。

(8) X線照射ラットから得られる血漿はin vitroにおける単巨核球、巨核球コロニーの分化における分類体系を確立するための刺激因子として非常に有用であると考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科 谷口昂教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり、直接御指導、御助言を賜りましたアメリカ合衆国テネシー州、St. Jude Children's Research Hospital, Dr. Carl W. Jacksonに深く感謝します。併せて、種々の御助力をいただいた金沢大学医学部小児科 小泉晶一講師、佐藤保助教授に深謝いたします。

なお本論文の要旨は第2回 Meeting of Cellular and Molecular Biology of Neoplasia (1983年、オンタリオ、カナダ)および第13回 Experimental Hematology Meeting (1984年、アトランタ、USA)において発表した。

文 献

- 1) Metcalf, D., MacDonald, H. R., Odartchenko, N. & Sordat, B.: Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1744-1748 (1975).
- 2) Nakeff, A. & Daniels-McQueen, S.: In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: Colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151, 587-590 (1976).
- 3) Burstein, S. A., Adamson, J. W., Thorning, D., & Harker, L. A.: Characteristics of murine megakaryocytic colonies in vitro. Blood 54, 169-179 (1979).
- 4) Mizoguchi, H., Kubota, K., Miura, V. & Takaku, F.: An improved plasma culture system for the production of megakaryocyte colonies in vitro. Exp. Hematol. 7, 345-351 (1979).
- 5) Levin, J., Levin, F. C. & Metcalf, D.: The

- effects of acute thrombocytopenia on megakaryocyte-CFC and granulocyte-macrophage-CFC in mice: Studies of bone marrow and spleen. *Blood* **56**, 274-283 (1980).
- 6) **Lieschke, G. J.**: Kinetics of the formation of pure and heterogenous megakaryocyte colonies by megakaryocyte progenitor cells in vitro. *Exp. Hematol.* **10**, 78-89 (1982).
- 7) **Williams, N. & Jackson, H.**: Kinetic analysis of megakaryocyte numbers and ploidy levels in developing colonies from mouse bone marrow cells. *Cell Tissue Kinet.* **15**, 483-494 (1982).
- 8) **Penington, D. G.**: Megakaryocyte colony culture using a liver cell conditioned medium. *Blood Cells* **5**, 13-23 (1979).
- 9) **Hoffman, R., Mazur, E., Bruno, E. & Floyd, V.**: Assay of an activity in the serum of patients with disorders of thrombopoiesis that stimulates formation of megakaryocytic colonies. *N. Engl. J. Med.* **305**, 533-538 (1981).
- 10) **Enomoto, K., Kawakita, M., Kishimoto, S., Katayama, N. & Miyake, T.**: Thrombopoiesis and megakaryocyte colony stimulating factor in the urine of patients with aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* **45**, 551-556 (1980).
- 11) **Kawakita, M., Enomoto, K., Katayama, N., Kishimoto, S. & Miyake, T.**: Thrombopoiesis and megakaryocyte colony-stimulating factors in the urine of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **48**, 609-615 (1981).
- 12) **Messner, H. A., Jamal, N. & Izaguirre, C.**: The growth of large megakaryocyte colonies from human bone marrow. *J. Cell. Physiol. (suppl)* **1**, 45-51 (1982).
- 13) **Zajicek, J.**: Studies on the histogenesis of blood platelets. *Acta. Haematol. (Basel)* **12**, 238-244 (1954).
- 14) **Jackson, CW.**: Cholinesterase as a possible marker for early cells of the megakaryocytic series. *Blood* **42**, 413-421 (1973).
- 15) **Karnovsky, M. J. & Roots, L.**: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219-221 (1964).
- 16) **Ebbe, S. & Phalen, E.**: Dose autoregulation of megakaryocytopoiesis occur? *Blood Cells* **5**, 123-138 (1979).
- 17) **Vainchenker, W., Chapman, J., Deschamps, J. F., Vinci, G., Bouguet, J., Titeux, M. & Breton-Gorius, J.**: Normal human serum contains a factor (s) capable of inhibiting megakaryocyte colony formation. *Exp. Hematol.* **10**, 650-660 (1982).
- 18) **Humphries, R. K., Eaves, A. C. & Eaves, C. J.**: Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3629-3633 (1981).
- 19) **Sodicoff, M. & Binhammer, R. T.**: Leukocytosis-induced factor in the blood of x-irradiated rats. *Radiat. Res.* **33**, 82-93 (1968).
- 20) **Odell, T. T. Jr., Jackson, C. W. & Friday, T. J.**: Effects of radiation on the thrombocytopoietic system of mice. *Radiat. Res.* **48**, 107-115 (1971).
- 21) **Odell, T. T. Jr.**: Radiation effects on the megakaryocyte and platelet system, p.109-116, In *Manual on Radiation Haematology*, Technical Reports Series No.123. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1971.
- 22) **Nakeff, A. & Bryan, J. E.**: Megakaryocyte proliferation and its regulation as revealed by CFU-M analysis, p.241-259, In *Golde, D. W., Cline, M. J., Metcalf, D. & Fox, C. F. (ed.): Hematopoietic Cell Differentiation*. Academic, Orlando FL, 1978.
- 23) **McDonald, T. P., Lange, R. D., Congdon, C. C. & Toya, R. E.**: Effect of hypoxia, irradiation and bone marrow transplantation on erythropoietin levels in mice. *Radiat. Res.* **42**, 151-163 (1970).
- 24) **McLeod, D. L., Shreeve, M. M. & Axelrad, A. A.**: Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature* **261**, 492-494 (1976).
- 25) **Dukes, P. P., Izadi, P., Ortega, J. A., Shore, N. A. & Gomperts, E.**: Inhibitory effects of interferon on mouse megakaryocytic progenitor cells in culture. *Exp. Hematol.* **8**, 1048-1056 (1980).
- 26) **Freedman, M. H., McDonald, T. P. & Saunders, E. F.**: Differentiation of murine marrow megakaryocyte progenitors (CFU_m): Humoral control in vitro. *Cell Tissue Kinet.* **14**, 53-58 (1981).
- 27) **Kalmaz, G. D. & McDonald, T. P.**: The effects of thrombopoietin on megakaryocytopoiesis of mouse bone marrow cells in vitro, p.77-82, In *Evatt, B. L., Levine, R. F. & Williams, N. T. (ed.): Megakaryocyte Biology and Precursors: In Vitro Cloning and Cellular Properties*. Elsevier North Holland, New York, 1981.

- 28) Kalmaz, G. D. & McDonald, T. P. : Effects of antiplatelet serum and thrombopoietin on the percentage of small acetylcholinesterase-positive cells in bone marrow of mice. *Exp. Hematol.* 9, 1002-1010 (1981).
- 29) Burstein, S. A., Adamson, J. W., Erb, S. K. & Harker, L. A. : Megakaryocytopoiesis in the mouse: Response to varying platelet demand. *J. Cell. Physiol.* 109, 333-341 (1981).
- 30) Williams, N., Eger, R. R., Jackson, H. M. & Nelson, D. J. : Two-factor requirement for murine megakaryocyte colony formation. *J. Cell. Physiol.* 110, 101-104 (1982).
- 31) Levin, J. : Review : Murine megakaryocytopoiesis in vitro : An analysis of culture systems used for the study of megakaryocyte colony-forming cells and of the characteristics of megakaryocyte colonies. *Blood* 61, 617-623 (1983).
- 32) Nakeff, A., Dicke, K. A., & Van Noord, M. J. : Megakaryocytes in agar cultures of mouse bone marrow. *Ser. Haematol.* 8, 4-21 (1975).
- 33) Nakeff, A. : Colony-forming unit, megakaryocyte (CFU-m) : Its use in elucidating the kinetics and humoral control of the megakaryocytic committed progenitor cell compartment, p.111-123, In Baum, S.J., Ledney, G. D. (ed.), *Experimental Hematology Today*. Springer-Verlag, New York, 1977.
- 34) Vainchenker, W., Guichard, J., Breton-Gorius, J. : Growth of human megakaryocyte colonies in culture from fetal, neonatal and adult peripheral blood cells, Ultrastructural analysis. *Blood Cells* 5, 25-43 (1979).
- 35) Vainchenker, W., Bouguet, J., Guichard, J., & Breton-Gorius, J. : Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors. *Blood* 54, 904-945 (1979).
- 36) Mazur, E. M., Hoffman, R., & Bruno, E. : Regulation of human megakaryocytopoiesis, An in vitro analysis. *J. Clin. Invest.* 68, 733-741 (1981).
- 37) Kawakita, M., Miyake, T., Kishimoto, S., Ogawa, M. : Apparent heterogeneity of human megakaryocyte colony-and thrombopoiesis-stimulating factors: Studies on urinary extracts from patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 52, 429-438 (1982).
- 38) Kawakita, M., Ogawa, M., Goldwasser, E., & Miyake, T. : Characterization of human megakaryocyte colony-stimulating factor in the urine extracts from patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 61, 556-560 (1983).

Increases in Circulating Megakaryocyte Growth-Promoting Activity in the Plasma of Rats Following Whole Body Irradiation Masayoshi Miura, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. J. J. Soc. Med.* 94, 734-743 (1985)

Key words: megakaryocyte growth-promoting activity, whole body irradiation, plasma

Abstract

To gain insight into the regulation of megakaryocyte precursors in vivo, we assayed in vitro megakaryocyte growth-promoting activity (Meg-GPA) in the plasma of rats in which both marrow hypoplasia and thrombocytopenia had been induced by irradiation. Rats received whole body irradiation of 834 rad from ^{137}Cs source. Plasma was collected consecutively at various intervals of hours to days, up through the 21st day of postirradiation, and was tested, at a concentration of 30%, for Meg-GPA on bone marrow cells cultured in the medium containing 1.1% methylcellulose with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol. With normal rat plasma, no megakaryocyte colonies (defined as ≥ 4 megakaryocyte) were seen and only a few single megakaryocytes and clusters (defined as 2 or 3 megakaryocyte) were formed. Two peaks of plasma Meg-GPA were observed after irradiation. The first appeared at 12hr, before any decrease in marrow megakaryocyte concentration or platelet count. The second occurred on days 10-14 after

irradiation, after the nadir in megakaryocyte concentration and while platelet counts were at their lowest levels. A dose response study of plasma concentration and megakaryocyte growth, using plasma collected 11 days postirradiation, demonstrated that patterns of megakaryocyte growth were related to plasma concentration in the culture medium; formation of single megakaryocytes was optimal over a range of 20%-30% plasma concentration, while cluster and colony formation were optimal at a plasma concentration of 30%. All forms of megakaryocyte growth were decreased with 40% plasma. There was a linear relationship between the number of bone marrow cells plated and growth of single cells, clusters and colonies using a concentration of 30% plasma collected 11 days after irradiation. We conclude that irradiation causes time-related increases in circulating megakaryocyte growth-promoting activity. We suggest that an irradiated rat is a good model for studying the relationships between Meg-GPA and megakaryocyte or platelet concentration in vivo.